

Xenotransplantation – Nya möjligheter



Axel Eriksson

*Uppsala
2018*

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serien: 2018:23

Xenotransplantation - Nya möjligheter

Xenotransplantation - New options

Axel Eriksson

Handledare: *Caroline Fossum och Magnus Åbrink, institutionen
för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Examinator: *Maria Löfgren, institutionen för biomedicin och
veterinär folkhälsovetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: *Självständigt arbete i veterinärmedicin*

Kurskod: EX0700

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2018

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

Delnummer i serie: 2018:23

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: *Xenotransplantation, CRISPR/Cas9, PERV, Rejection, Gris*

Key words: *Xenotransplantation, CRISPR/Cas9, PERV, Rejection, Pig*

**Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
MATERIAL OCH METODER	3
LITTERATURÖVERSIKT	4
Varför sker avstötningsreaktioner?	4
<i>Hyperakut avstötning</i>	4
<i>Akut humoral avstötning</i>	4
<i>Akut cellulär avstötning</i>	5
<i>Kronisk avstötning</i>	5
Grisens virom	5
CRISPR/Cas9-tekniken	6
Hur förebyggs xenotransplantationsproblematiken?	8
DISKUSSION	9
Tekniska aspekter	9
Etik	10
LITTERATURFÖRTECKNING	11

SAMMANFATTNING

Transplantation innebär att ett organ eller vävnad tas från en individ och ges till en annan individ med behov av organet eller vävnaden. Ett problem globalt är att det finns för få tillgängliga organ för transplantation. Xenotransplantation skulle kunna vara lösningen på problemet och därför har xenotransplantation från gris till människa utvärderats sedan 90-talet. Xenotransplantation innebär att organ eller vävnad tas från en individ och ges till en individ av annan art. Det ger dock upphov till fyra immunologiska avstötningsreaktioner: hyperakut-, akut humoral-, akut cellulär- och kronisk avstötning. Att utveckla metoder som förhindrar dessa avstötningsreaktioner har därför varit av stor betydelse.

Frågeställning i den här litteraturstudien har rört varför avstötningsreaktioner uppstår, hur det porcina viromet påverkar förutsättningarna för xenotransplantation, hur CRISPR/Cas9-systemet fungerar och hur den tekniken kan tillämpas för att driva utvecklingen med mål att göra xenotransplantation från gris till människa kliniskt möjligt.

En del i problematiken med xenotransplantation mellan gris och människa är grisens endogena retrovirus (PERV). Dessa skulle kunna överföras till människor vid xenotransplantation och sedan liksom andra retrovirus orsaka immunosuppression och tumörbildning.

För att förhindra dessa problem har man försökt överbrygga den genetiska skillnaden mellan människor och grisar genom genetiska modifieringar. Tack vare olika gentekniker har nu mycket av den initiala problematiken med xenotransplantation övervunnits. Den hyperakuta avstötningen har förebyggts genom att ta bort grisens gen som ger uttryck av galaktos-alfa-1,3-galaktos (gal) och modifierat grisorgan så att de uttrycker humana regulatoriska komplementfaktorer vilket ytterligare har förbättrat överlevnadstiden för xenotransplantat.

Med utvecklandet av CRISPR/Cas9-systemet och dess applicering inom xenotransplantation har PERV-fria grisar tagits fram. CRISPR/Cas9 är ett effektivt verktyg för modifiering av gener i eukaryota celler. Till skillnad från tidigare tekniker som "zinc finger nucleases" (ZFN) och "transcription activator-like effector nuclease" (TALEN) tycks CRISPR/Cas9 inducera färre risker vid genmodifiering och produktion av CRISPR/Cas9-systemet är dessutom mindre tidskrävande.

SUMMARY

Transplantation is a process where you take an organ or tissue from one person and give to another in need of a new organ or tissue. A global problem is that there are too few organs and tissue available for transplantation. Xenotransplantation could be the solution to the worldwide problem and xenotransplantation from pigs to humans has been evaluated since the 90's. Xenotransplantation is a process where you take an organ or tissue from one individual and give it an individual of a different species. Xenotransplantation from pig to primates gives rise to 4 graft rejection reactions: hyper acute, acute vascular, acute cellular and chronic rejection. The development of methods to prevent graft rejection reactions has therefore been of great importance.

In this literature review the approached questions are why graft rejection reactions occur, how the porcine virome affects the conditions for xenotransplantation, how the CRISPR/Cas9 system works and how that technology can be applied to forward the development of xenotransplantation.

One of the problems with xenotransplantation between man and pig are the porcine endogenous retro virus (PERV). This has worried the scientists as the viruses could potentially be transferred to humans from pigs and then like other retroviruses cause immunosuppression and tumourgenesis.

To prevent these problems, scientists have tried to bridge the genetic difference between primates and pigs through genetic engineering. Today much of the initial problems of xenotransplantation have been successfully counteracted. The hyper acute rejection has been counteracted by removing the pig's expression of gal molecules and engineering of pig organs to express human complement decay molecules has further improve the survival time of xenografts. Through the development of the CRISPR/Cas9 system and its application in xenotransplantation PERV-free pigs have been developed.

CRISPR/Cas9 is an effective tool to remove and insert genes in eukaryotic cells. Unlike previous technologies, *e.g.* ZFN and TALEN, that were more complicated, it is more secure and less time consuming to build systems targeting specific gene sequences with the CRISPR/Cas9 technique.

INLEDNING

Många människor har på grund av olyckor eller kronisk sjukdom behov av ett eller flera nya organ. I Sverige stod det 685 personer på väntelistan för nya organ i januari 2018. Under 2017 utfördes det 820 transplantationer och det dog samtidigt 21 personer som inte fick nya organ i tid. För att sätta detta i ett större perspektiv så bodde det ungefär 10 miljoner människor i Sverige i januari 2018. Vid samma tidpunkt bodde det ungefär 326 miljoner människor i USA och av dessa stod ungefär 125 000 på väntelista för nya organ. Det utfördes under 2017 i USA 34 770 transplantationer och det dog cirka 6000 personer i väntan på nya organ (Scandiatransplant, 2018; OPTN, 2018).

Tusentals människor dör alltså varje år på grund av brist på nya organ eftersom efterfrågan är större än utbudet. Människor idag med behov av nya organ eller vävnader får dem ifrån levande eller avlidna personer som valt att donera sina organ och vävnader till behövande. Transplantation av organ eller vävnader mellan två individer av samma art kallas för allotransplantation. I avsikt att eliminera bristen på nya organ håller en annan typ av transplantation på att utvecklas, xenotransplantation. Xenotransplantation innebär att organ eller vävnad överförs från en individ till en individ av en helt annan art. För xenotransplantation till människa har man valt att rikta in sig på att använda grisar som donatordjur. Valet av gris baseras bland annat på lämplig storlek på organ, liknande fysiologi och att grisar är lätta att avla och föda upp. Ett stort problem med xenotransplantat som överförs från grisar till primater är att grisorganen ger upphov till kraftiga avstöttningsreaktioner vilket förstör de transplanterade organen. Utöver det bär alla grisar på porcina endogena retrovirus (PERV) och dessa skulle potentiellt sett kunna infektera människor vid xenotransplantation med immunosuppression och tumörbildning som följd. Det krävs därför flera förebyggande åtgärder innan xenotransplantation kan bli tillämpbar på människa (Denner, 2017).

Frågeställningar i den här litteraturstudien är varför avstöttningsreaktioner uppstår, hur det porcina viromet påverkar förutsättningarna för xenotransplantation, hur CRISPR/Cas9-systemet fungerar och hur tekniken kan tillämpas för att driva på utvecklingen med målet att göra xenotransplantation kliniskt möjligt.

MATERIAL OCH METODER

Underlaget till litteraturoversikten har inhämtats från databaserna Primus, Pubmed och Web of Science. Sökorden användes på de olika databaserna var Xenotransplant*, Pig* OR swine* OR piglet* Or boar* OR Sow*, CRISPR/Cas9 OR CRISPR OR Cas9, PERV OR porcine endogenous retrovirus, Rejection samt Gal. De användes ensamma eller i kombination med andra sökord.

LITTERATURÖVERSIKT

Varför sker avstötningsreaktioner?

Det absolut största problemet vid xenotransplantation, likt allotransplantation, är att mottagarens immunsystem inte godkänner det nya främmande organet. Immunsystemet svarar med att stöta bort organet genom flera olika väldefinierade avstötningsreaktioner. En avstötningsreaktion kan initieras bara några minuter efter att blodflödet har återställts i xenotransplantatet. När mottagarens immunförsvar känner av främmande molekyler eller celler från transplantatet startar det ett immunsvär. Skadorna som följer leder till att organet slutar fungera. Xenotransplantation ger upphov till fyra olika typer av avstötningsreaktioner: hyperakut-, akut humoral-, cellulär- och kronisk avstötning (Meier *et al.*, 2018).

Hyperakut avstötning

Hyperakut avstötning uppstår från minuter till timmar efter genomförd xenotransplantation. Förloppet börjar med inbindning av preformerade antikroppar till endotelantigen i det transplanterade organet. Den i särklass viktigaste antigena strukturen som initierar den hyperakuta avstötningen är disackariden galaktos-alfa-1,3-galaktos (gal). Gal uttrycks på de flesta däggdjurs cellmembran, men även på ytan av vissa bakterier och virus. Människo- och markattartade apor saknar dock gal-uttryck på sina celler då genen som kodar för enzymet som bygger gal-disackariden har gått förlorad under evolutionen. En följd av detta är att primater bildar naturliga antikroppar mot gal och eftersom gal uttrycks hos gris kan de preformerade antikropparna direkt binda och initiera skada i det transplanterade organet. När antikroppar har bundit till gal kan cirkulerande komplementfaktorer interagera med antikropparna och aktivera komplementsystemet vilket leder till bildningen av "membrane attack complex" (MAC). Resultat blir att endotelceller dels lyseras och att endotelcellerna aktiveras vilket leder till en ökad koagulationsbenägenhet. Organet förstörs slutligen som en följd av interstitiella ödem, blödningar och trombos (Joziase & Oriol, 1999; Igaz, 2001; Galili, 2005; Cooper *et al.*, 2015; Puga Yung *et al.*, 2017; Meier *et al.*, 2018).

Akut humoral avstötning

Genom att bland annat tömma mottagare av xenotransplantat på anti-gal-antikroppar kan den hyperakuta avstötning undvikas (Lam *et al.*, 2004). Organet kan dock fortfarande avstötas inom några dagar via akut humoral avstötning. Till skillnad från den hyperakuta avstötning som till stor del initieras av gal så riktas mottagarens immunförsvar mot ett flertal andra grisantigen vid akut humoral avstötning. Denna avstötningsreaktion medieras av antikroppar, komplementfaktorer och celler från det medfödda immunförsvaret. Komplementaktivering via antikroppsinbindning orsakar skador på endotelceller. Immunceller från det medfödda immunförsvaret, främst natural killer (NK) -celler, inducerar apoptos i xenotransplantatets celler genom antikropsberoende cellmedierad cytotoxicitet (ADCC). Antikroppar som bundit till främmande antigen uttrycker en Fc-region. FC-receptorer på NK-cellen känner igen området och binder NK-cell till antikroppen. Efter inbindningen till antikroppen kan NK-cellen frisätta granzymmer som gör att den främmande cellen genomgår apoptos. Neutrofiler frisätter syreradikaler som skadar kärlväggen och utsöndrar cytokiner (Shimizu & Yamada, 2006; Puga Yung *et al.*, 2017; Meier *et al.*, 2018).

Akut cellulär avstötning

Immunsvaret vid akut cellulär avstötning är främst adaptivt och det uppstår från veckor till månader efter en genomförd transplantation. Det adaptiva immunsvaret initieras normalt av att antigenpresenterande celler (APC), framför allt dendritiska celler (DC), plockar upp antigen och presenterar detta på "major histocompatibility complex" (MHC)-II. DC vandrar sedan till närmaste lymfknuta där naiva CD4⁺ T-celler aktiveras genom att de binder till MHC-II och främmande peptid med hjälp av sina T-cellsreceptorer (TCR). Naiva B-celler aktiveras också i lymfknutorna men då av fritt cirkulerande porcint antigen. Aktiverade CD4⁺ T-celler kan sedan aktivera cytotoxiska T-celler (CTL) som fått signal 1 av DC genom cross-presentation av antigen via deras MHC-I.

Vid allo- och xenotransplantation av organ tycks T-celler kunna bli aktiverade genom två vägar, "direct pathway" eller "indirect pathway". "Direct pathway" innebär att mottagarens T-celler via sin TCR direkt binder in till swine leukocyte antigen (SLA), grisens motsvarighet till humana MHC-molekyler, på det transplanterade organet celltor. Detta leder till att CTL börjar angripa den främmande vävnaden. "Indirect pathway" initieras när mottagarens T-celler via TCR binder in till kroppseget MHC-II som presenterar porcint antigen. Det leder till en CD4⁺ T-cellsaktivering vilka kan utsöndra cytokiner som driver på inflammation och även inducera en switch av antikroppsklassen som produceras av det aktiverade B-cellerna (Puga Yung *et al.*, 2017; Meier *et al.*, 2018; Higginbotham *et al.*, 2015; Scalea *et al.*, 2012).

Kronisk avstötning

Vid kronisk avstötning som normalt inträffar månader efter transplantation är de exakta mekanismerna fortfarande inte helt kartlagda, det verkar dock vara ett resultat av flera faktorer. Aktivering av endotelceller i organet tack vare antikroppar och/eller komplement, celler från medfödda immunförsvaret och/eller blodplättars interaktion med endotelceller vilket leder till uttryck av "tissue factor" (TF) och förlust av antikoagulatoriska protein. TF är ett protein som fungerar som receptor och kofaktor till faktor 7 i koagulationskaskaden. När TF exponeras för blodcirkulationen vid skador kan faktor 7 binda in till TF och detta startar "tissue factor pathway" i koagulationskaskaden (McVey, 1999). Även bristande molekyllär kompatibilitet mellan arternas proteiner som reglerar koagulationen tros spela in. Forskare har bland annat visat att grisens trombomodulin (TM) är en sämre kofaktor till humant protein C än det human TM. Protein C har en antikoagulativ verkan och på grund utav detta tros xenotransplant av grisorgan bidra till en ökad koagulationsbenägenhet i mottagaren (Roussel *et al.*, 2008; Iwase *et al.*, 2014).

Grisens virom

Utöver beskrivna avstötningsreaktioner kan delar av grisens virom potentiellt sett orsaka problem vid xenotransplantation. Det krävs dock fler studier för att utröna vilka porcina virus som eventuellt kan infektera mänskliga celler och vilka konsekvenser det skulle ge upphov till. Några virus har dock blivit uppmärksammade. I en retrospektiv studie av Yamada *et al.* (2014) noterades en markant reduktion i överlevnadstid av grisenjurar som transplanterats till människoapor om njurcellerna bar på cytomegalovirus. Risken med överföring av porcina virus kan dock i stor utsträckning förebyggas genom moderna djurhållningsmetoder, selektiv avel

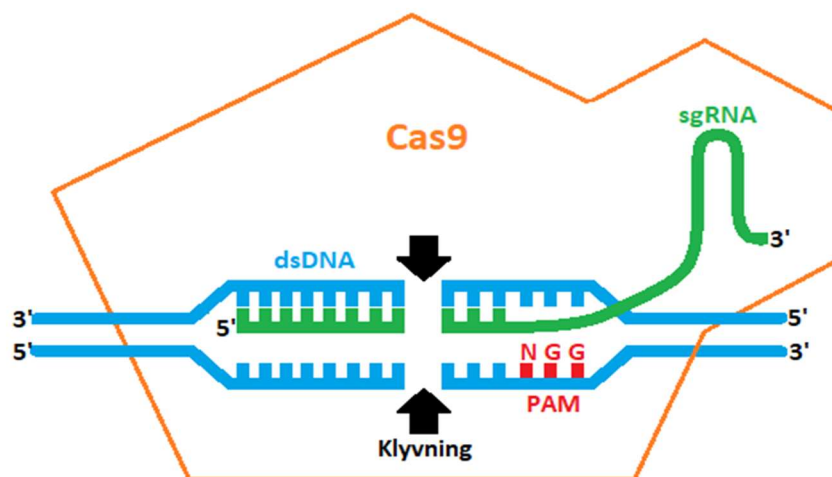
och andra förebyggande åtgärder. Dock kan inte alla virus förebyggas och det virus som anses mest bekymmersamt med avseende på xenotransplantation är porcint endogent retrovirus, PERV.

Dessa virus förekommer naturligt i alla grisgenom världen över beroende på PERV förmåga att omvandla sitt RNA till DNA och inkorporera det i värdcellers genom som ett provirus. Provirus ligger vilande i värdcellers genom och förs vidare till dotterceller vid celldelning och kan också spridas horisontellt till värddjurens avkommor via könscellerna. Det har inte bevisats om PERV kan överföras till människor vid *in vivo* studier, men i *in vitro* studier har PERV från grisceller kunnat infektera mänskliga celler. Även en xenogen retrovirusinfektion skulle kunna leda till immunosuppression och tumörbildning i värddjuret och det har därför varit av yttersta vikt att eliminera förekomsten av PERV i grisar (Denner & Tönjes, 2012; Denner, 2017; Niu *et al.*, 2017).

CRISPR/Cas9-tekniken

CRISPR/Cas9-tekniken är ett effektivt verktyg som används för genmodifiering av eukaryota celler. Tekniken bygger på en naturligt förekommande försvarsmekanism i bakterier och arkéer som ger mikroorganismerna ett adaptivt skydd mot främmande genetiskt material vid virusinfektioner. CRISPR/Cas-system delas in i olika typer baserat på deras uttryck av Cas-proteiner. CRISPR/Cas9 system tillhör typ 2 och det som utmärker klassen är att försvarsmekanismen bara behöver ett fåtal molekyler för att fungera till skillnad från de andra mer komplicerade typerna (Deltcheva *et al.*, 2011).

CRISPR/Cas-systemen ligger inkodade i mikroorganismernas genom och skyddar dessa genom att inkorporera korta sekvenser av främmande genetiska material i genomet vid infektion. Dessa sekvenser translateras vid en efterföljande infektion av samma genetiska material till CRISPR RNA (crRNA) som har till uppgift att vägleda Cas-proteiner som är enzymer med uppgift att klyva DNA. I CRISPR/Cas9 systemen krävs det ytterligare en komponent för att Cas9-proteinet ska aktiveras, transactivating-RNA (tracrRNA), som binder in till crRNA. crRNA leder sedan Cas-proteinet till en komplementär sekvens på det främmande genetiska materialet varpå Cas inducerar ett dubbelsträngsbrott så det främmande genomet inaktiveras (Zhang *et al.*, 2015; Bortesi & Fischer, 2015).



Figur 1: Cas9-proteinet klipper dubbelsträngat DNA vid en nukleotidsekvens som är komplementär till dess sgRNA om kontrollsekvensen PAM finns närvarande

För att kunna använda CRISPR/Cas9-system för genmanipulering i eukaryota celler krävs det tre komponenter: Cas9-protein, crRNA och tracrRNA. De två senare kan fuseras till ett syntetiskt framställt single guide RNA (sgRNA). De första 20 nukleotiderna i sgRNA:t avgör vilken sekvens den är komplementär med, dvs. hur målsekvens ser ut. För att Cas9 sedan ska kunna klyva dubbelsträngat DNA när dess sgRNA har bundit till komplementärt DNA måste det finnas ett närliggande protospacer adjacent motif (PAM). Ett PAM är en specifik sekvens på 3 nukleotider och det som krävs för att Cas9 ska initiera klyvningen är vanligen sekvensen NGG (Jinek *et al.*, 2012).

Efter ett dubbelsträngsbrott på DNA kan cellen reparera brottet på två olika sätt, icke-homolog sammanfogning (NHEJ) eller homolog rekombination (HR). NHEJ är cellens normala mekanism vid dubbelsträngsbrott. Vid NHEJ används ingen reparationsmall utan dubbelsträngsbrottet byggs ihop av reparationsproteiner. Det leder oftast till frameshift och förlust av genfunktion om brottet skett i ett exon. Vid reparation via HR kan man "hjälpa" cellen genom att introducera en exogen reparations mall vid dubbelsträngsbrottet. Det sker då en rekombination mellan DNA strängarna och mallen vilket gör att DNA-sekvensen sätts in vid brottet (Hsu *et al.*, 2014).

Zinc-finger nucleases (ZFNs) och transcription activator-like effector nucleases (TALENs) är två andra metoder som användes mycket innan CRISPR/Cas9-tekniken utvecklades. Dessa kan designas för att klyva specifika DNA-sekvenser med hög specificitet i jämförelse med föregående transgentekniker. ZFN och TALEN är dock komplicerade och tidskrävande att framställa och behöver designas specifikt för varje målsekvens i ett genom. CRISPR/Cas9-system går fort att producera eftersom det enda som behöver designas på nytt är ett sgRNA som ska vara komplementärt med den önskade DNA-sekvensen i genen som ska modifieras. I fallet xenotransplantation är CRISPR/Cas9-tekniken ett lovande verktyg för att inaktivera/eliminera PERV i grisorgan (Komor *et al.*, 2017).

Hur förebyggs xenotransplantationsproblematiken?

Gal är i särklass den viktigaste molekylen för initieringen av hyperakut avstötning av grisorgan i människa. För att motverka den hyperakuta avstötningen har det blivit standard att grisar som används i xenotransplantationsforskning saknar $\alpha 1,3$ -galaktostransferas-genen, enzymet som sätter dit gal på grisens celler (Phelps *et al.*, 2003; Galili, 2005).

Det har även visat sig att grisar som uttrycker humana regulatoriska komplementfaktorer (hCPRP) såsom CD46 eller CD55 i kombination med GalT-KO ger xenotransplantatet ett bättre skydd mot avstötningsreaktioner. CD46 eller membrane cofactor protein (MCP) är en cofactor till faktor I som irreversibelt inhiberar komplementaktivering (Begum *et al.*, 2000). CD55 eller decay accelerating factor (DAF) hämmar också komplementaktivering genom att förhindra bildningen av C3- och C5-konvertas som annars förstärker komplementkaskaden (Lublin & Atkinson, 1989).

I en studie av Azimzadeh *et al.* (2015) undersöktes tidig avstötning av njurar och hjärtan i GalT-KO-grisar med eller utan uttryck av hCPRP. Tidig avstötning definierades som avstötning inom 3 dygn från genomförd transplantation. Resultaten visade att vid transplantation GalT-KO organ hade det skett tidig avstötning i 9 av 21 babianer, 43%. Vid transplantation av GalT-KO organ som uttryckte hCPRP skedde det tidig avstötning i endast 1 av 14 babianer, 7%.

I en studie mottog 4 babianer njurar från 2 genetiskt manipulerade grisar. Babianerna delades in två grupper, A och B. Grisen som donerade njurar till grupp A hade 6 genetiska modifieringar: GalT-KO och uttryck av humant CD46 och CD55, de två humana koagulationsreglerande proteinerna "endothelial protein C receptor" (EPCR) och "tissue factor pathway inhibitor" (TFPI) samt CD47. CD47 kan inhibera makrofagaktivitet och därigenom minska inflammation och organskada. Grisen i Grupp B hade 3 genetiska modifieringar: GalT-KO, uttryck av humant CD46 och det humana koagulationsreglerande proteinet trombomodulin (TM). En av babianerna i varje grupp fick även en dos med cobra venom factor vilken tömmer mottagaren tillfälligt på komplementfaktorer. Utöver detta var grisarna av blodtyp -0 och babianerna hade selekterats efter låga antikropps nivåer mot grisantigen. Resultatet i studien var att trots samma immunosupprimerande behandling och en liknande nivå av antikroppar blev forskningsgruppen tvungna att avliva babianerna i grupp B efter tolv dagar på grund av koagulationsrubbningar. I grupp A överlevde den ena babianen ungefär 7 månader innan den avled på grund av infektion och den andra avlivades efter 8 månader på grund av infektion (Iwase *et al.*, 2017).

I en *in vitro* studie inducerades mutationer i alla PERV sekvenser i en cellinje från gris med hjälp av CRISPR/cas9-tekniken. Dessa mutationerna gjorde replikationen av virus obetydlig samt sänkte spridningen av PERV till människoceller till en tusendel jämfört med grisceller med intakta PERV (Yang *et al.*, 2015). Efter den studien gick forskarna vidare och lyckades producera PERV-fria grisar genom kloning med hjälp av "somatic cell nuclear transfer" (SCNT) med cellkärnor där CRISPR/Cas9-medierad knockout av PERV skett (Niu *et al.*, 2017).

DISKUSSION

Vad är det som krävs för att xenotransplantation ska bli realitet? Avstöttningsreaktioner och farliga virus är två aspekter, men det finns även andra såsom etiska dilemman. Diskussionsdelen har jag därför delat upp i en teknisk och etisk del.

Tekniska aspekter

I samband med att forskare genom transgenteknik lyckades slå ut genen för Gal såg man också att frekvensen av hyperakut avstötning sjönk markant. Studier visar även att insertioner av humana gener (hCPRP) såsom MCP och DAF ökar överlevnadschanser genom att inhibera komplementaktiveringen. Utöver detta verkar grisens koagulationsregulatoriska proteiner inte vara lika effektiva på att reglera koagulationskaskaden som de humana.

“Importantly, new xenoreactive antigens are progressively discovered as well, and they may require the generation of new KO pigs” (Meier *et al.*, 2018).

Citatet från Meier *et al.* leder till frågan om det är genomförbart att slå in och ut så många molekyler i en gris att immunsvaret blir minimalt vid xenotransplantation. För att det skulle vara genomförbart behöver en annan fråga besvaras, hur mycket kan ett genom manipuleras? Vid genmodifiering kan det uppstå ”off-target” effekter. ”Off-target” betyder att de endonukleaser som idag används, då guidningen inte är 100% med dagens system, orsakar dubbelsträngsbrott på fler platser i genomet än det önskade vilket introducerar okontrollerade/oönskade mutationer (Zhang *et al.*, 2015). Därmed borde en cellinje som genmanipulerats ett flertal gånger med en teknik där ”off-target” effekter är vanligt kunna ackumulera skadliga mutationer till den grad att cellinjen blir genomiskt instabil. Genomisk instabilitet är ett begrepp som beskriver en cell med hög frekvens av mutationer i sitt genom och är en egenskap som kopplas samman med cancer (Yao & Dai, 2014). En cell med genomisk instabilitet har förvärvat en försämrad förmåga till korrekt reparation av sitt DNA och mutationer introduceras därför med en högre frekvens.

Jag tror att det som är viktigast för att motverka den eventuella problematiken är dels god träffsäkerhet och goda diagnostiska metoder för att påträffa ”off-target” effekter. Om producenterna av de transgena djuren ska lyckas producera ”perfekta” xenotransplantationsdjur behöver de vara säkra på att de inte förändrar genomet mer än nödvändig i cellinjerna.

Knock-out av gal och andra främmande molekyler som initierar immunsvaret i mottagaren har även en annan positiv effekt i det stora hela. I takt med att fler xeno-immunogena proteiner slås ut och komplementregulatoriska proteiner slås in kommer det kanske att krävas mindre och mindre immunosupprimerande behandling av patienten. Det vill säga om triggnande faktorer tas bort behöver immunsystemet inte hämmas i lika stor utsträckning för att organet ska accepteras i mottagaren. Immunförsvaret är då kapabelt att i en större utsträckning motverka infektioner i mottagare av xenotransplantat.

PERV var en av de riskfaktorer som talade mot grisen som donatordjur under 90-talet och framåt. Risken att virus skulle sprida sig vidare till mänskliga celler, vilket hade bevisats i *in vitro* studier, ville man inte riskera. Men när forskarna lyckades med att slå ut PERV ur en griscellinje och sedan klonat fram en PERV-fri grisbesättning var det därmed ett stort steg framåt

för fortsatt forskningen runt xenotransplantation (Niu *et al.*, 2017). En annan aspekt är att de, även om grisarna som donerar organ är helt PERV-fria, kan bära på andra skadliga virus som Hepatit E- och cytomegalovirus. Det krävs därför en större förståelse för hur grisens virom eventuellt kan påverka människan. Det kommer vara av yttersta vikt att ha ett gott samarbete mellan djur- och humansidan. Virusrelaterade sjukdomsfall på humansidan kan då förebyggas genom riktad avel och SPF-besättningar på djursidan. Ett One Health perspektiv på xenotransplantation skulle kunna vara lösningen på det här problemet.

Etik

Vi föder idag upp grisar för konsumtion och försöksdjursverksamhet. När xenotransplantation blir mer och mer verkligt behöver vi också ställa oss frågan hur vi ser på att hålla djur för att skörda deras organ. Det försiggår redan diskussioner om huruvida vi människor ska ha rätten att föda upp andra djur för att äta dem, hur kommer mottagandet att vara när man föreslår uppfödning av grisar för organdonation? En potentiell lösning skulle kunna vara att förena köttproduktionen med xenotransplantation. Det vill säga om det var möjligt att bedriva en verksamhet där det gick att ta ut organ för xenotransplantation och samtidigt använda köttet från grisarna på ett säkert sätt. Det skulle göra att antal grisar som används inte ökade.

För att xenotransplantation ska kunna börja användas storskaligt krävs det först kliniska studier. Det är i princip omöjligt att veta vilka problem och komplikationer ett xenotransplantat kommer att ge upphov till i en människa. Apmodellerna som används idag ger en viss indikation om möjliga konsekvenser men det kan även ske ytterligare komplikationer när xenotransplantation tillämpas på människor. Det kommer därför vara av stor vikt att de mänskliga deltagarna i de initiala studierna får en tydlig bild av vad ett ingrepp innebära. Det krävs en total transparens där deltagarna ska vara medvetna om vad som kan ske, men även hur lite vetskap det finns om eventuella komplikationer. De människor som kan tänkas vara aktuella för en xenotransplantation är med stor sannolikhet svårt sjuka i organsvikt. Det är då av största vikt att de är medvetna om riskerna för att inte invaggas i falska förhoppningar så att de kan förhålla sig till huruvida de är villiga att chansa.

Sammanfattningsvis så är xenotransplantation ett spännande område som har stor potentiell att motverka den globala problematiken med bristen på organ. Tekniska aspekter och etiska dilemman kan försvåra både kliniska studier och faktisk produktion av grisar som skall donera organ. Det krävs därmed mer forskning och förfinade metoder innan xenotransplantation kommer gå att tillämpa på människa.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Azimzadeh, A. M., Kelishadi, S. S., Ezzelarab, M. B., Singh, A. K., Stoddard, T., Iwase, H., Zhang, T., Burdorf, L., Sievert, E., Avon, C., Cheng, X., Ayares, D., Horvath, K. A., Corcoran, P. C., Mohiuddin, M. M., Barth, R. N., Cooper, D. K. C. & Pierson, R. N. (2015). EARLY GRAFT FAILURE OF GalTKO PIG ORGANS IN BABOONS IS REDUCED BY EXPRESSION OF A HUMAN COMPLEMENT PATHWAY-REGULATORY PROTEIN. *Xenotransplantation*, 22(4), pp 310–316.
- Begum, N. A., Murakami, Y., Mikata, S., Matsumoto, M., Hatanaka, M., Nagasawa, S., Kinoshita, T. & Seya, T. (2000). Molecular remodelling of human CD46 for xenotransplantation: designing a potent complement regulator without measles virus receptor activity. *Immunology*, 100, pp 131–139.
- Bild på framsidan (2018).
<https://pixabay.com/sv/sitta-sittande-sitt-ner-gris-djur-2672653/> [2018-03-08]
- Bortesi, L. & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), pp 41–52.
- Cooper, D. K. C., Ekser, B. & Tector, A. J. (2015). Immunobiological barriers to xenotransplantation. *International Journal of Surgery*, 23, pp 211–216 (Special Issue: Xenotransplantation).
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J. & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by *trans*-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), pp 602–607.
- Denner, J. (2017). The porcine virome and xenotransplantation. *Virology Journal*, 14, p 171.
- Denner, J. & Tönjes, R. R. (2012). Infection Barriers to Successful Xenotransplantation Focusing on Porcine Endogenous Retroviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), pp 318–343.
- Galili, U. (2005). The α -gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy. *Immunology and Cell Biology*, 83(6), pp 674–686.
- Higginbotham, L., Ford, M. L., Newell, K. A. & Adams, A. B. (2015). Preventing T cell rejection of pig xenografts. *International Journal of Surgery*, 23, pp 285–290 (Special Issue: Xenotransplantation).
- Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), pp 1262–1278.
- Igaz, P. (2001). Recent strategies to overcome the hyperacute rejection in pig to human xenotransplantation. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 74(5), pp 329–340.
- Iwase, H., Hara, H., Ezzelarab, M., Li, T., Zhang, Z., Gao, B., Liu, H., Long, C., Wang, Y., Cassano, A., Klein, E., Phelps, C., Ayares, D., Humar, A., Wijkstrom, M. & Cooper, D. K. C. (2017). Immunological and physiological observations in baboons with life-supporting genetically engineered pig kidney grafts. *Xenotransplantation*, 24(2), p n/a-n/a.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), pp 816–821.
- Joziasse, D. H. & Oriol, R. (1999). Xenotransplantation: the importance of the Gal α 1,3Gal epitope in hyperacute vascular rejection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1455(2), pp 403–418.
- Komor, A. C., Badran, A. H. & Liu, D. R. (2017). CRISPR-based technologies for the manipulation of eukaryotic genomes. *Cell*, 168(1–2), pp 20–36.

- Lam, T. T., Hausen, B., Boeke-Purkis, K., Paniagua, R., Lau, M., Hook, L., Berry, G., Higgins, J., Duthaler, R. O., Katopodis, A. G., Robbins, R., Reitz, B., Borie, D., Schuurman, H.-J. & Morris, R. E. (2004). Hyperacute rejection of hDAF-transgenic pig organ xenografts in cynomolgus monkeys: influence of pre-existing anti-pig antibodies and prevention by the α GAL glycoconjugate GAS914. *Xenotransplantation*, 11(6), pp 517–524.
- Lublin, D. M. & Atkinson, J. P. (1989). Decay-Accelerating Factor: Biochemistry, Molecular Biology, and Function. *Annual Review of Immunology*, 7(1), pp 35–58.
- McVey, J. H. (1999). Tissue Factor pathway. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 12(3), pp 361–372.
- Meier, R. P. H., Muller, Y. D., Balaphas, A., Morel, P., Pascual, M., Seebach, J. D. & Buhler, L. H. (2018). Xenotransplantation: back to the future? *Transplant International* [online]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tri.13104/abstract>. [Accessed 2018-02-02].
- Niu, D., Wei, H.-J., Lin, L., George, H., Wang, T., Lee, I.-H., Zhao, H.-Y., Wang, Y., Kan, Y., Shrock, E., Lesha, E., Wang, G., Luo, Y., Qing, Y., Jiao, D., Zhao, H., Zhou, X., Wang, S., Wei, H., Güell, M., Church, G. M. & Yang, L. (2017). Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*, 357(6357), pp 1303–1307.
- Organ Procurement and Transplantation Network, OPTN (2018). *National Data*.
<https://optn.transplant.hrsa.gov/data/view-data-reports/national-data/> [2018-03-03]
- Phelps, C. J., Koike, C., Vaught, T. D., Boone, J., Wells, K. D., Chen, S.-H., Ball, S., Specht, S. M., Polejaeva, I. A., Monahan, J. A., Jobst, P. M., Sharma, S. B., Lamborn, A. E., Garst, A. S., Moore, M., Demetris, A. J., Rudert, W. A., Bottino, R., Bertera, S., Trucco, M., Starzl, T. E., Dai, Y. & Ayares, D. L. (2003). Production of α 1,3-Galactosyltransferase-Deficient Pigs. *Science*, 299(5605), pp 411–414.
- Puga Yung, G., Rieben, R., Bühler, L. & Schuurmann, H. *Xenotransplantation: Where do we stand in 2016?* [online] (2017-02-09). Available from: <https://smw.ch/article/doi/smw.2017.14403/>. [Accessed 2018-02-16].
- Roussel, J. C., Moran, C. J., Salvaris, E. J., Nandurkar, H. H., D’Apice, A. J. F. & Cowan, P. J. (2008). Pig Thrombomodulin Binds Human Thrombin but Is a Poor Cofactor for Activation of Human Protein C and TAFI. *American Journal of Transplantation*, 8(6), pp 1101–1112.
- Scandiatransplant (2018). Transplantation and donation figures for 2017.
http://www.scandiatransplant.org/data/sctp_figures_2017_4Q.pdf [2018-03-03]
- Scalea, J., Hanecamp, I., Robson, S. C. & Yamada, K. (2012). T-cell-mediated immunological barriers to xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 19(1), pp 23–30.
- Shimizu, A. & Yamada, K. (2006). Pathology of renal xenograft rejection in pig to non-human primate transplantation. *Clinical Transplantation*, 20, pp 46–52.
- Underlag till Figur 1: CRISPR/Cas9 system (2017).:
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:GRNA-Cas9.png> [2018-03-08]
- Yang, L., Güell, M., Niu, D., George, H., Lesha, E., Grishin, D., Aach, J., Shrock, E., Xu, W., Poci, J., Cortazio, R., Wilkinson, R. A., Fishman, J. A. & Church, G. (2015). Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs). *Science*, 350(6264), pp 1101–1104.
- Yao, Y. & Dai, W. (2014). Genomic Instability and Cancer. *Journal of carcinogenesis & mutagenesis* [online], 5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4274643/>. [Accessed 2018-03-11].

Zhang, X.-H., Tee, L. Y., Wang, X.-G., Huang, Q.-S. & Yang, S.-H. (2015). Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 4(11), p e264.